



(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/10, C12P 19/18, C12N 1/21, C12Q 1/6		A1	(11) 国際公開番号 WO99/40205
			(43) 国際公開日 1999年8月12日(12.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00321			
(22) 国際出願日 1999年1月27日(27.01.99)			
(30) 優先権データ 特願平10/23389	1998年2月4日(04.02.98)	JP	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小泉聰司(KOIZUMI, Satoshi)[JP/JP] 尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP) 遠藤徹夫(ENDO, Tetsuo)[JP/JP] 〒194-0022 東京都町田市森野4-17-17 Tokyo, (JP) 田畑和彦(TABATA, Kazuhiko)[JP/JP] 〒194-0022 東京都町田市森野4-17-9 Tokyo, (JP)			

(54)Title: GLYCOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THE SAME

(54)発明の名称 糖転移酵素および該酵素をコードするDNA

(57) Abstract

A protein having a β 1,4-galactosyltransferase activity; a DNA encoding this protein; a recombinant DNA containing this DNA; a transformant carrying this recombinant DNA; a process for producing β 1,4-galactosyltransferase by using this transformant; and a process for producing a galactose-containing saccharide by using the above transformant.

(57)要約

本願発明によれば、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた β 1, 4-ガラクトース転移酵素の製造法、および該形質転換体を用いたガラクトース含有糖質の製造法を提供することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	L I リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	L K スリ・ランカ	S I スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	L R リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	L S レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	L T リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	L U ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	L V ラトヴィア	TD チャード
BB ベルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドバ	T J タジキスタン
BF ブルガリア	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴースラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	Z A 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	Z W ジンバブエ
CN 中国	J P 日本	NZ ニュージーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

糖転移酵素および該酵素をコードするDNA

技術分野

本願発明は、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた β 1, 4-ガラクトース転移酵素の製造法、および該形質転換体を用いたガラクトース含有糖質の製造法に関する。

背景技術

β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子に関して、動物由来の遺伝子 [J. Biol. Chem., 263, 10420 (1988)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 657 (1988)、Eur. J. Biochem., 183, 211 (1989)]、ナイセリア・ガナリーア由来の遺伝子 [WO 96/10086] およびストレプトコッカス・ニューモニエ由来の遺伝子 [Mol. Microbiol., 26, 197 (1997)] が取得されている。

また、ヘリコバクター・ピロリのリポ多糖のO抗原は哺乳動物のルイスX [$\text{Gal} \beta 1-4(\text{Fuc} \alpha 1-3)\text{GlcNAc}$] およびルイスY [$\text{Fuc} \alpha 1-2\text{Gal} \beta 1-4(\text{Fuc} \alpha 1-3)\text{GlcNAc}$] エピトープと同じ構造を有しており、ヘリコバクター・ピロリにおいて β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性の存在が予測されている [Glycobiology, 5, 683 (1995)]。該微生物において、既知の β 1, 4-ガラクトース転移酵素と相同意の高いタンパク質は知られておらず、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子は特定されていない [Nature, 388, 539 (1997)]。

発明の開示

本願発明の目的は、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを用いた β 1, 4-ガラクトース転移酵素

活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたガラクトース含有糖質の製造法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ヘリコバクター・ピロリのゲノムライブラリーから β 1, 4-ガラクトース転移酵素の活性を指標にしたスクリーニングを行うことにより、これまで特定されていなかった該糖転移酵素遺伝子を取得し、その配列決定をして、本願発明を完成するに至った。

即ち、本願発明の第1の発明は、

以下の(a)または(b)の蛋白質：

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) (a)の蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質である。

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

本願発明の第2の発明は、上記蛋白質をコードするDNA、配列番号2記載の塩基配列を有するDNA、または配列番号2記載の塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAからなるDNAである。

上記の「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号2で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本願発明の第3の発明は、上記DNAをベクターに組み込んで得られる組換えDNAである。

本願発明の第4の発明は、上記組換えDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体である。

本願発明の第5の発明は、上記形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記蛋

白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法である。

本願発明の第6の発明は、上記形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、糖基質およびウリジン二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトースを β 1, 4結合で糖基質に転移させることによりガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法である。

以下に本願発明を詳細に説明する。

[1] 本願発明のDNAの調製

(1) ゲノムDNAライブラリーの作製

本願発明のDNAはヘリコバクター属に属する微生物より調製することができる。

ヘリコバクター属に属する微生物としては、例えばヘリコバクター・ピロリをあげることができ、具体的にはヘリコバクター・ピロリ NCTC11637 株等をあげることができる。

ヘリコバクター属に属する微生物を公知の方法〔例えば、Mol. Microbiol., 20, 833 (1996)〕により培養する。

培養後、公知の方法（例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー）により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

得られた染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、シュークロース密度勾配超遠心分離等の手法によりDNA断片を分画し、2~6 kbのDNA断片を回収する。

常法〔例えば、モレキュラー・クローニング第2版等〕に準じて、該回収DNA断片を、大腸菌用発現ベクターのプロモーターの下流に挿入した組換え体DNAを作成し、該組換え体DNAを大腸菌に導入することによりゲノムDNAライブラリーを作製することができる。

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTacl、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社製〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescriptII SK+（ストラタジーン社製）、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pTrs30（FERM BP-5407）、pTrs32(FERM BP-5408)、pGHA2(FERM BP-400)、pGKA2(FERM B-6798)、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕、pGEX（ファルマシア社製）、pET-3（ノバジェン社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示することができる。

大腸菌としては、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

(2) スクリーニングおよび本願発明のDNAの調製

上記で作製したゲノムDNAライブラリーの大腸菌を通常の方法〔例えば、L

B培地〔バクトトリプトン（ディフコ社製）10g／l、酵母エキス（ディフコ社製）5g／l、NaCl 5g／l（pH 7.2）〕を用い、20～45℃で5～24時間] 培養する。

培養後、培養液を遠心分離し、湿菌体を取得する。

該湿菌体を用い、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を指標として、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子を有する大腸菌をスクリーニングする。該スクリーニング法は公知の方法 [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] に準じて、あるいは下記の方法で行うことができる。

該湿菌体、50 mM MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, monohydrate] (pH 6.0)、10 mM MnCl₂、0.2 mM ウリジン二リン酸ガラクトース(UDP-Gal)、0.4% ナイミーンS-215および後述の参考例1に準じた方法で調製したLNT-2 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) の蛍光標識体を0.2 mM含む反応液0.02 ml中で37℃で16時間反応を行う。

反応終了後、遠心分離により菌体を除去し、上清を取得する。

該上清をシリカゲル-60 TLCプレート（メルク社製）上に乗せ、酢酸エチル：メタノール：水：酢酸=7：2：1：0.1で展開し、展開終了後プレートを乾燥し、UV 365 nmによりスポットの確認を行う。

大腸菌湿菌体の代わりに β 1, 4-ガラクトース転移酵素（シグマ社製）を行い同様の操作を行い、該操作により生じたラクト-N-ネオテトラオース(LNT: Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) の蛍光標識体（蛍光標識LNT）に相当するTLC上のスポットを確認する。

大腸菌湿菌体を用いた操作において、該TLCプレート上で蛍光標識LNTと同じ位置にスポットの現われる大腸菌を β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子を有する菌株として選択する。

選択されたクローンより常法（例えば、モレキュラー・クローニング第2版等）により目的とするDNAを取得することができる。

取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジテオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは 373A-DNA シークエンサー (パーキン・エルマー社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

該DNAを組み込むベクターとしては、pBluescript KS(+) (ストラタジーン社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) (ストラタジーン社製)、pT7Blue (ノバジェン社製)、pCR II (インビトロジェン社製)、pCR-TRAP (ジーンハンター社製) および pNoTA_{T7} (5プライム → 3プライム社製)などをあげることができる。

上記のようにして取得された新規な塩基配列を有するDNAとして、例えば、配列番号2で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号2で表される配列を有するDNAを保有するプラスミドを保有する大腸菌として、例えば Escherichia coli NM522/pPT1 (FERM BP-6226) をあげることができる。

また、上記により決定された塩基配列に基づいたプライマーを調製し、ゲノムDNAライブラリーを鋳型として、PCR法 (PCR Protocols, Academic Press (1990)) により目的とするDNAを取得することができる。

更に、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

[2] 本願発明の蛋白質の調製

本願発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記[1]に記載の方法により取得した本願発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

本願発明のDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることができる。

該DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本願発明の蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中の組込が可能で、本願発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本願発明の蛋白質遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本願発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pET-3（ノバジェン社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescriptII SK+（ストラタジーン社製）、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pTrS30〔大腸菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製〕、pTrS32〔大腸菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製〕、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28(宝

酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター(Plac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、p_{en}Pプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター(Ptrp x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、lEIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャインダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本願発明の組換え体DNAにおいては、本願発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Cory-

nebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YE_p24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris 等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8（フナコシ社より市販）、pAGE107（特開平3-22979）、pAS3-3（特開平2-227075）、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp（インビトロジェン社製）、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103 [J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pAMo、pAMoA等を用いることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のIE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637（特開昭63-299）等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vecto

rs, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Molecular Biology, A Laboratory Manual, Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・スクレナー・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスピレッション・ベクターズ ア・ラボラトリ・マニュアル）等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスペクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモータ

一、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本願発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本願発明の蛋白質を製造することができる。

..... 二、二三の実施例

等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーピリカ、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添

加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6～8、25～40℃、5% CO₂ 存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地〔ファーミンジエン社製〕、Sf-900 II SFM 培地（ライフ・テクノロジーズ社製）、ExCell400、ExCell405〔いずれも JRH バイオサイエンシーズ社製〕、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6～7、25～30℃ 等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシケ・アンド・スクーゲ(MS) 培地、ホワイト(White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 5～9、20～40℃ の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本願発明の蛋白質をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

本願発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細

胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本願発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本願発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本願発明の蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子增幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本願発明の蛋白質を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

動物個体を用いて本願発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本願発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、本願発明の蛋白質をコードするDNAを導入した

トランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて本願発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本願発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養、20（1994）、組織培養、21（1995）、Trends in Biotechnology, 15, 45（1997）〕に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

本願発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、本願発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん渦後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）ーセファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、ク

ロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本願発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、本願発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティーコロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウラの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本願発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティーコロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本願発明のポリペプチドをF1agペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗F1ag抗体を用いるアフィニティーコロマトグラフィーにより精製

することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティーコロマトグラフィーで精製することもできる。

上記で取得された蛋白質のアミノ酸情報を基に、F m o c 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、t B o c 法 (t -ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法により、本願発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument 社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[3] ガラクトース含有糖質の調製

上記[2]記載の培養により得られた形質転換体の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中でガラクトース含有糖質を製造することができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

ガラクトース含有糖質の生成において用いられる酵素源は、37℃で1分間に $1\ \mu\text{モル}$ のガラクトース含有糖質を生成することのできる活性を1単位(U)として、 $0.1\text{mU}/1\sim10,000\text{U}/1$ であり、好ましくは $1\text{mU}/1\sim1,000\text{U}/1$ の濃度で用いる。

ガラクトース含有糖質の生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、

酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

ガラクトース含有糖質の生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミーンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネットなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ガラクトース含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50g/lの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50ml/lの濃度で用いられる。

ガラクトース含有糖質の生成において用いられる糖ヌクレオチド基質であるウリジン二リン酸ガラクトース（UDP-Gal）としては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものを用いることができる。

該糖ヌクレオチド基質は0.1～500mMの濃度で用いる。

ガラクトース含有糖質の生成において用いられる糖基質としては、糖転移酵素の基質となるものであればいずれも用いることができ、例えば、グルコース(Glc)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc(LNT-2)の他、非還元末端の糖がGlcまたはGlcNAcであるオリゴ糖などを例示することができる。

該糖基質は0.1～500mMの濃度で用いる。

該生成反応において、必要に応じてMnCl₂等の無機塩、 β -メルカプトエタノール等を添加することができる。

ガラクトース含有糖質の生成反応は水性媒体中、pH 5～10、好ましくはpH 6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。

水性媒体中に生成したガラクトース含有糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる〔化学と工業、43, 953 (1990)〕。

反応液中に生成したガラクトース含有糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、N-アセチルラクタミンにおいてはJ. Org. Chem., 47, 5416 (1982)記載の方法に準じて行うことができる。

図面の簡単な説明

第1図 第1図は β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子発現プラスミドpPT1の構造を示す。

第2図 第2図は発現プラスミドpPA31およびpPAC31の造成工程を示す。

第3図 第3図はlgtA遺伝子発現プラスミドpNT59の造成工程を示す

【符号の説明】

Amp^r : アンピシリン耐性遺伝子

P_{trp} : トリプトファンプロモーター

P_L : P_Lプロモーター

cI857 : cI857 リプレッサー

lgtA : β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子

Gal Tase : β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれら実施例に限定されるものではない。

以下に本願発明の実施例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 ヘリコバクター・ピロリゲノムライブラリーの作製

Helicobacter pylori (NCTC11637, ATCC43504) を Mol. Microbiol., 20. 833 (1996) に記載の方法で培養した。

培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

該染色体DNA 10 μ gを制限酵素Sau3A Iで部分分解後、シーケロース密度勾配超遠心分離によりDNA断片を分画し、2~6 kbの断片を回収した。

該DNA断片 0.5 μ gおよび制限酵素BamH Iで切断後ホスファターゼ処理したpUC118 DNA 0.2 μ g (宝酒造社製) をライゲーションキット(宝酒造社製) を用いて、16°C、16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB寒天培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製) 10 g/l、酵母エキス (ディフコ社製) 5 g/l、NaCl 5 g/l (pH 7.2)、寒天 15 g/l] に塗布後、30°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換株を β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子のスクリーニングに供した。

実施例2. スクリーニング

実施例1で作製したヘリコバクター・ピロリ由来のDNA断片を保有する大腸菌株を10株ずつまとめてアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB培地 0.8 mlの入った48穴マイクロ・プレートに接種し、37°Cで17時間培養した。

該培養液 150 μ l 分を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

スクリーニングの反応は該大腸菌湿菌体、50 mM MES (pH 6.0)、10 mM MnCl₂、0.2 mM UDP-Gal、0.4% ナイミーンS-215および後述の参考例1で調製したFCHASE-LNT-2を0.2 mM含む反応液0.02 ml 中で37°Cで16時間反応を行った。

反応終了後、遠心分離により菌体を除去し、上清を取得した。

該上清をシリカゲル-60 TLCプレート（メルク社製）上に乗せ、酢酸エチル：メタノール：水：酢酸=7：2：1：0.1で展開し、展開終了後プレートを乾燥し、UV 365nmによりスポットの確認を行った。

大腸菌湿菌体の代わりに β 1,4-ガラクトース転移酵素（シグマ社製）を用い同様の操作を行い、該操作により生成された蛍光標識ラクト-N-ネオテトラオース(FCHASE-LNnT)のTLC上の位置を確認した。

FCHASE-LNnTと同じTLC上の位置に現われる大腸菌湿菌体の集団から単集落分離した菌株について、同様のスクリーニングを実施して、 β 1,4-ガラクトース転移酵素活性を示す菌株である(Escherichia coli NM522/pPT1)を選択した。

Escherichia coli NM522/pPT1株は平成10年1月20日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号3050046）にFERM BP-6226として寄託されている。

この菌株の保有するプラスミドpPT1について、その構造を解析したところプラスミドpUC118のBamH I部位にヘリコバクター・ピロリ由来の2kb断片が挿入した図1に示すような構造を有していた。

該2kb挿入断片のDNA塩基配列を決定したところ配列表の配列番号2に示すようなオープンリーディングフレーム(ORF)が見い出された。該ORFに対応するアミノ酸配列を配列番号1に示した。

実施例3. N-アセチルラクトサミンの生産

実施例2で得たEscherichia coli NM522/pPT1株をアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ を含むLB培地 $8\text{m}\text{l}$ の入った大型試験管に接種し 28°C で17時間培養した。該培養液をアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ を含むLB培地 $8\text{m}\text{l}$ の入った大型試験管に1%接種し 37°C で5時間培養した。該培養液 $0.1\text{m}\text{l}$ 分を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存する可能で、使用前に解凍して用いることができる。

該湿菌体($0.1\text{m}\text{l}$ 分)、 $50\text{mM MES}(\text{pH }6.0)$ 、 10mM MnCl_2 、 0.2mM GlcNAc 、 0.2mM UDP-Gal 、 0.4% ナイミーンS-215からなる $0.1\text{m}\text{l}$ の反応液中で、 37°C 、16時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に $12.7\text{mg}/\text{l}$ のN-アセチルラクトサミンが生成蓄積していることを確認した。

実施例4. ラクト-N-ネオテトラオースの生産

実施例2で得たEscherichia coli NM522/pPT1株をアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ を含むLB培地 $8\text{m}\text{l}$ の入った大型試験管に接種し 28°C で17時間培養した。該培養液をアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ を含むLB培地 $8\text{m}\text{l}$ の入った大型試験管に1%接種し 37°C で5時間培養した。

該培養液 $0.1\text{m}\text{l}$ 分を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存する可能で、使用前に解凍して用いることができる。

該湿菌体($0.1\text{m}\text{l}$ 分)、 $50\text{mM MES}(\text{pH }6.0)$ 、 10mM MnCl_2 、 0.2mM UDP-Gal 、 0.4% ナイミーンS-215および参考例2で調製したLNT-2を 0.2mM 含む反応液 $0.1\text{m}\text{l}$ 中で、 37°C 、16時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を

用いて分析し、反応液中に 61.6 mg/l のラクト-N-ネオテトラオースが生成蓄積していることを確認した。

実施例 5. β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子高発現プラスミドの造成

配列番号 3 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 4 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した。

該合成 DNA をプライマーとして、実施例 2 記載のプラスミド pPT1 の DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は pPT1 DNA 1 ng、プライマー各 0.5 μ M、Pfu DNA ポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5 unit/s、Pfu DNA ポリメラーゼ用 ×10 緩衝液（ストラタジーン社製）4 μ l、dideoxyNTP 各 200 μ M を含む反応液 40 μ l を用い、94°C-1 分、42°C-2 分、72°C-3 分の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] 飽和フェノール／クロロホルム (1 vol/1 vol) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80°C に 30 分放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。

該 DNA の沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 SacI および BamH I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより 0.9 kb の断片を回収した。参考例 1 に示した pPAC31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 SacI および BamH I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 0.9 kb および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16

℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素遺伝子高発現プラスミドであるpPT7を得た。

実施例6. N-アセチルラクトサミンの生産

実施例5で得た大腸菌NM522/pPT7株および大腸菌NM522/pNT25/pNT32(WO98/12343)を、アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地 125ml の入った1L容バッフル付き三角フラスコに接種し、30℃、220rpmの条件で17時間培養した。

該培養液 125ml をグルコース $10\text{g}/\text{l}$ 、バクトトリプトン(ディフコ社製) $12\text{g}/\text{l}$ 、酵母エキス(ディフコ社製) $24\text{g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $2.3\text{g}/\text{l}$ (別殺菌)、 K_2HPO_4 $12.5\text{g}/\text{l}$ (別殺菌)、アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成からなる液体培地(pH無調整) 2.5L の入った5L容培養槽に接種し、30℃で4時間、更に40℃で3時間、600rpm、通気量 $2.5\text{L}/\text{分}$ の条件で培養を行った。

該培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液をpH7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを $5\text{g}/\text{l}$ から $30\text{g}/\text{l}$ 添加した。該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存する事が可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株を、グルコース $50\text{g}/\text{l}$ 、ポリペプトン(日本製薬社製) $10\text{g}/\text{l}$ 、酵母エキス(オリエンタル酵母社製) $10\text{g}/\text{l}$ 、尿素 $5\text{g}/\text{l}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $5\text{g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $1\text{g}/\text{l}$ 、 K_2HPO_4 $3\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1\text{g}/\text{l}$ 、 CaCl_2

$2\text{H}_2\text{O}$ 0. 1 g / l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg / l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg / l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg / l、L-システィン 20 mg / l、D-パントテン酸カルシウム 10 mg / l、ビタミンB1 5 mg / l、ニコチニ酸 5 mg / l、およびビオチン $30\mu\text{g}/\text{l}$ (10N NaOH で pH 7. 2 に調整) の組成からなる液体培地 20 ml の入った 300 ml 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28°C、220 rpm の条件で、24時間培養した。

該培養液 20 ml を上記と同一組成の液体培地 240 ml の入った 2 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28°C、220 rpm の条件で、24時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液 250 ml を、グルコース 150 g / l、肉エキス (極東製薬社製) 5 g / l、 KH_2PO_4 10 g / l、 K_2HPO_4 10 g / l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g / l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0. 1 g / l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg / l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg / l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg / l (別殺菌)、 β -アラニン 15 mg / l (別殺菌)、L-システィン 20 mg / l、ビオチン $100\mu\text{g}/\text{l}$ 、尿素 2 g / l、およびビタミンB1 5 mg / l (別殺菌) (10N NaOH で pH 7. 2 に調整) の組成からなる液体培地 2. 5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、32°C、600 rpm、通気量 2. 5 L / min の条件で 24 時間培養を行った。培養中、28% アンモニア水を用いて、培養液の pH を 6. 8 に維持した。

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することができる、使用前に解凍して用いることができる。

大腸菌 NM522/pPT7 株湿菌体 50 g / l、大腸菌 NM522/pNT25/pNT32 株湿菌体 40 g / l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g / l、ガラクトース 50 g / l、フラクトース 50 g / l、GlcNAc 50 g / l、 KH_2PO_4 15 g / l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g / l、フィチン酸 5

g／l、オロット酸（カリウム塩）10 g／l、ナイミーンS-215 4 g／l、キシレン 10 ml／l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、22 時間反応を行った。反応中、4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持した。

該反応により、反応液中に 60.0 g／l の N-アセチルラクトサミンが生成した。

参考例 1 蛍光標識 LNT-2 (FCHASE-LNT-2) の調製

[1] 蛍光標識ラクトース (FCHASE-Lac) の調製

蛍光標識したラクトース (FCHASE-Lac) の調製は、アミノフェニルラクトース（シグマ社製）と 6-(5-fluorescein-carboxamido)-hexanoic acid succimidyl ester (FCHASE, モレキュラー・プロープ社製) から公知の方法 [J. Biol. Chem., 271, 19166 (1996)] により調製した。

[2] N-アセチルグルコサミン転移酵素発現菌株の造成

(1) 発現ベクター pPAC31 の造成

トリプトファンプロモーターを含むプラスミド pTrS30 (FERM BP-5407) および P_L プロモーターを含むプラスミド pPA1 (特開昭 63-233798)、pPAC1 (FERM BP-6054) については、これらのプラスミドを保有する菌株から公知の方法によりプラスミド DNA を単離精製した。

pTrS30 DNA 0.2 μ g を制限酵素 PstI および ClaI で切斷後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キット (バイオ 101 社製) により 3.4 kb の断片を回収した。pPA1 DNA 0.5 μ g を制限酵素 PstI および ClaI で切斷後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 1.0 kb の断片を回収した。

該 3.4 kb の断片および 1.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて、

16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/m1を含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 P_L プロモーターによる発現ベクターであるpPA31を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

pPA31 DNA 0.2μgを制限酵素PstIおよびClaIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより3.4kbの断片を回収した。pPAC1 DNA 0.5μgを制限酵素PstIおよびClaIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に2.3kbの断片を回収した。

該3.4kbの断片および2.3kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/m1を含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、cI857リプレッサーを含む P_L プロモーターによる発現ベクターであるpPAC31を取得した。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

(2) IgTA発現プラスミドの造成

ナイセリア・ガナリーア(Neisseria gonorrhoeae) ATCC33084株の染色体DNAを実施例1と同様の方法により単離精製した。

配列番号5記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号6記載のアンチセンス鎖DNAプライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した。

該合成DNAをプライマーとして、Neisseria gonorrhoeae ATCC33084株の染

色体DNAを錆型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA 0.1 μg、プライマー各0.5 μM、Pfu DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5 units、Pfu DNA ポリメラーゼ用×10緩衝液（ストラタジーン社製）4 μl、deoxyNTP各200 μMを含む反応液40 μlを用い、94℃-1分、42℃-2分、72℃-3分の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] 飽和フェノール／クロロホルム (1 vol/1 vol) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。

該DNAの沈殿を20 μlのTEに溶解した。該溶解液5 μlを用い、DNAを制限酵素Hind IIIおよびBamH Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより1.0 kbの断片を回収した。pBluescriptII SK+ DNA 0.2 μgを制限酵素Hind IIおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該1.0 kbおよび4.2 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μg/mIを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、1 g t A発現プラスミドであるpNT59Pを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（図3）。

該pNT59P DNA 0.5 μgを制限酵素ClaIおよびBamH Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し1.0 kbの断片を回

収した。上記で造成したpPAC31DNA 0.2 μ gを制限酵素ClaIおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5kbの断片を回収した。

該1.0kbおよび5.5kbの断片をライゲーションキットを用いて、16°C、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、1gtA発現プラスミドであるpNT59を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図3)。

[3] 蛍光標識LNT-2(FCHASE-LNT-2)の調製

上記で得たEscherichia coli NM522/pNT59株をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB培地8mlの入った大型試験管に接種し、28°Cで17時間培養した。該培養液をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB培地8mlの入った大型試験管に1%接種し、28°Cで4時間培養後、温度を40°Cに上げてさらに3時間培養した。

該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

該湿菌体20mg、50mM MES(pH 6.0)、10mM MnCl₂、20mM UDP-GlcNAc、0.4% ナイミーンS-215および上記[1]で調製したFCHASE-Lacを20mM含む反応液0.1ml中で、37°C、16時間反応を行った。

反応終了後、遠心分離により菌体を除去した上清をTLCにより分離した。

TLCによる分離はシリカゲル-60TLCプレート(メルク社製)を用い、酢酸エチル:メタノール:水:酢酸=7:2:1:0.1で展開することにより行った。

展開終了後、該TLCプレートを乾燥し、UV 365 nmによりスポットの確認を行った。

該TLC上のFCHASE-LNT-2に対応するスポットの部分をかきとり、水を用いて抽出した後、遠心分離・フィルターろ過によりシリカゲルを除いたものを凍結乾燥し、基質であるFCHASE-LNT-2を取得した。

参考例2 LNT-2基質の調製

ラクト-N-ネオテトラオース（オックスフォード・グライコシステムズ社製）に β -ガラクトシダーゼ（生化学工業社製）を作用させ、ラクト-N-ネオテトラオースの非還元末端のガラクトースを完全に除去した後、100℃で5分間熱処理することにより β -ガラクトシダーゼ活性を失活させた反応液をLNT-2基質として、上記実施例で用いた。

産業上の利用可能性

本願発明により、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素を遺伝子組換え手法により大量に生産することが可能となる。また、該酵素を用いることにより効率的にガラクトース含有糖質を製造できる。

請求の範囲

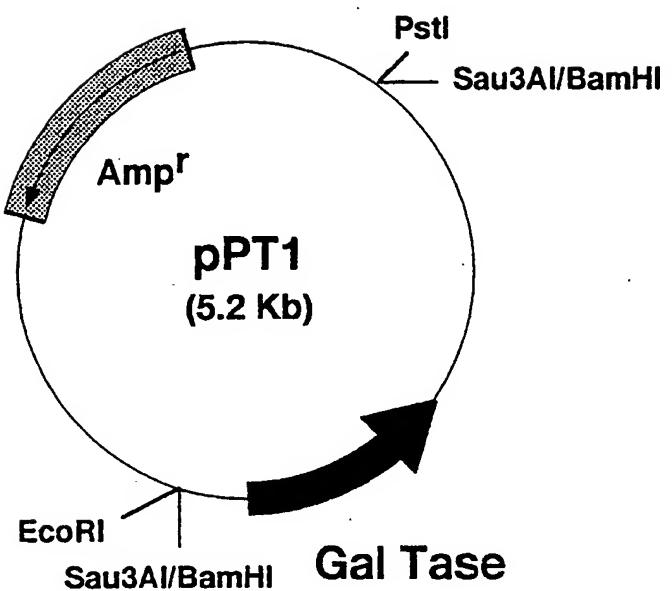
1. 以下の(a)または(b)の蛋白質。
 - (a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
 - (b) (a)の蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質
2. 請求項1記載の蛋白質をコードするDNA。
3. 以下の(a)または(b)のDNAからなるDNA。
 - (a) 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA
 - (b) (a)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA
4. DNAがヘリコバクター・ピロリ由来のDNAである、請求項2または3記載のDNA。
5. 請求項2～4に記載のDNAから選ばれるDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。
6. 組換え体DNAが、pPT1またはpPT7である、請求項5記載の組換え体DNA。
7. 請求項5または6記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。
8. 形質転換体が、エシェリヒア属に属する微生物である、請求項7記載の形質転換体。
9. 形質転換体が、エシェリヒア・コリNM522/pPT1またはエシェリヒア・コリNM522/pPT7である請求項8記載の形質転換体。
10. 請求項7～9いずれかに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に β 1, 4-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、 β 1, 4-ガラクトース転移酵

素活性を有する蛋白質の製造方法。

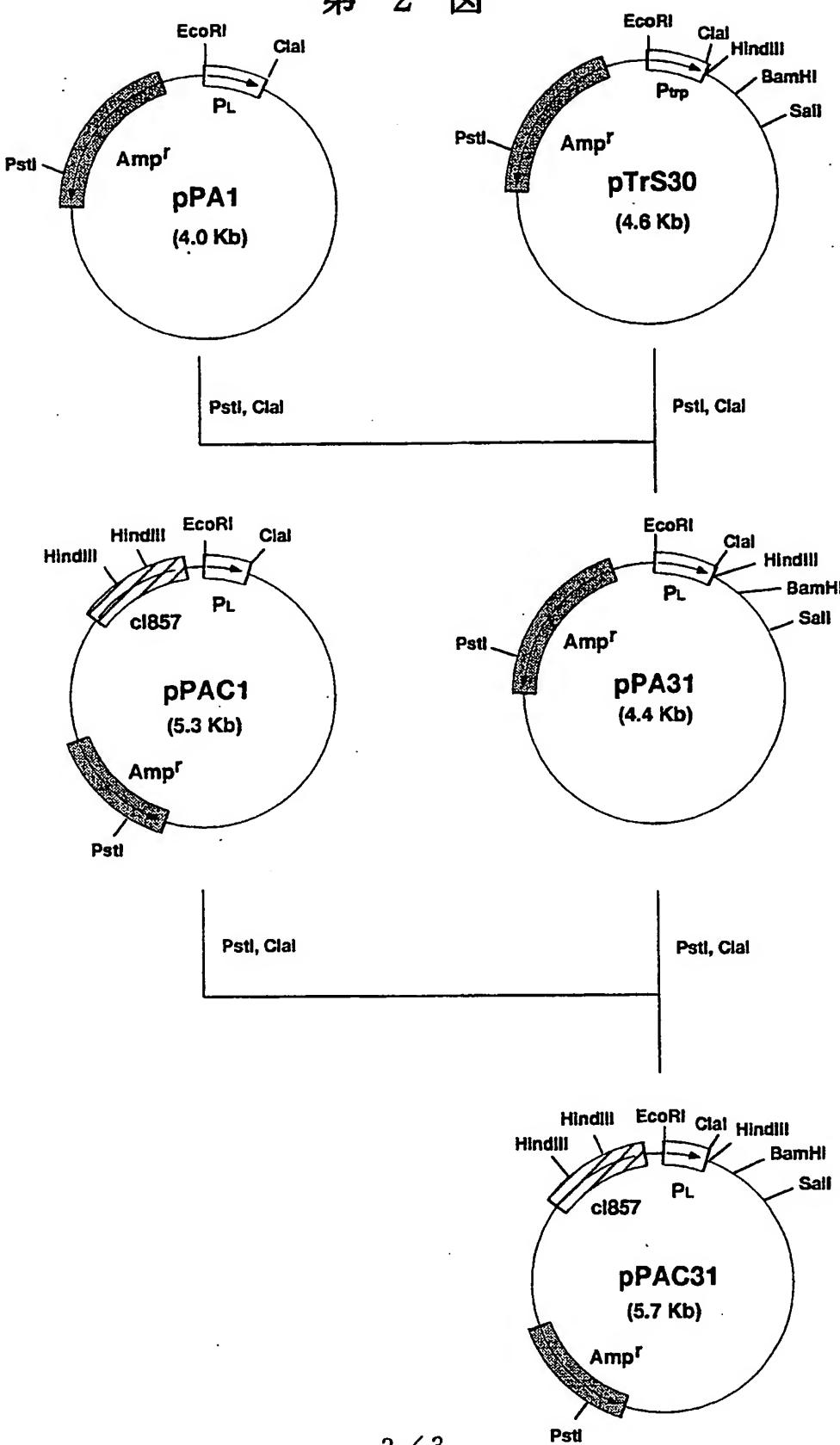
11. 請求項7～9いずれかに記載の形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、糖基質およびウリジン二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトースを β 1, 4結合で糖基質に転移させることによりガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法。

12. ガラクトース含有糖質が、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-ネオテトラオースおよびN-アセチルラクトサミンから選ばれるガラクトース含有糖質である、請求項11記載の製造法。

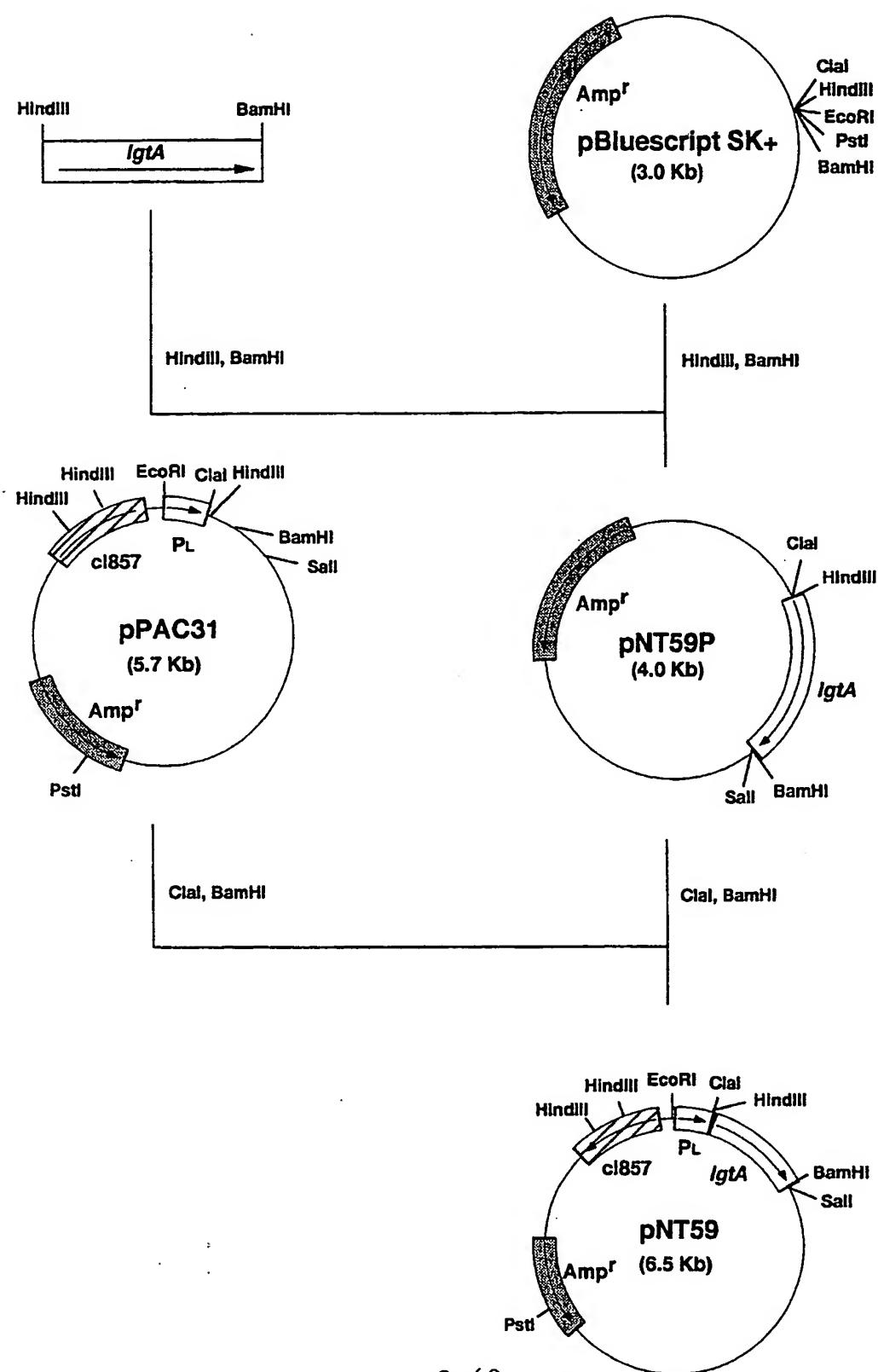
第 1 図



第 2 図



第 3 図



配列表
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Novel glycosyltransferase and a DNA coding for said enzyme

<130> 11112W01

<140>

<141>

<150> H10-023389

<151> 1998-02-4

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori

<400> 1

Leu Arg Val Phe Ile Ile Ser Leu Asn Gln Lys Val Cys Asp Thr Phe

1

5

10

15

Gly Leu Val Phe Arg Asp Thr Thr Thr Leu Leu Asn Asn Ile Asn Ala

20

25

30

Thr His His Gln Ala Gln Ile Phe Asp Ala Ile Tyr Ser Lys Thr Phe

35

40

45

Glu Gly Gly Leu His Pro Leu Val Lys Lys His Leu His Pro Tyr Phe

50

55

60

Ile Thr Gln Asn Ile Lys Asp Met Gly Ile Thr Thr Asn Leu Ile Ser

65

70

75

80

Glu Val Ser Lys Phe Tyr Tyr Ala Leu Lys Tyr His Ala Lys Phe Met

85

90

95

Ser Leu Gly Glu Leu Gly Cys Tyr Ala Ser His Tyr Ser Leu Trp Glu

100

105

110

Lys Cys Ile Glu Leu Asn Glu Ala Ile Cys Ile Leu Glu Asp Asp Ile

115

120

125

Thr Leu Lys Glu Asp Phe Lys Glu Gly Leu Asp Phe Leu Glu Lys His

130

135

140

Ile Gln Glu Leu Gly Tyr Val Arg Leu Met His Leu Leu Tyr Asp Pro
145 150 155 160

Asn Val Lys Ser Glu Pro Leu Asn His Lys Asn His Glu Ile Gln Glu
165 170 175

Arg Val Gly Ile Ile Lys Ala Tyr Ser His Gly Val Gly Thr Gln Gly
180 185 190

Tyr Val Ile Thr Pro Lys Ile Ala Lys Val Phe Lys Lys His Ser Arg
195 200 205

Lys Trp Val Val Pro Val Asp Thr Ile Met Asp Ala Thr Phe Ile His
210 215 220

Gly Val Lys Asn Leu Val Leu Gln Pro Phe Val Ile Ala Asp Asp Glu
225 230 235 240

Gln Ile Ser Thr Ile Ala Arg Lys Glu Glu Pro Tyr Ser Pro Lys Ile
245 250 255

Ala Leu Met Arg Glu Leu His Phe Lys Tyr Leu Lys Tyr Trp Gln Phe
260 265 270

Val

<210> 2

<211> 819

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 2

ttgcgtgttt ttatcatttc tttaaatcaa aaagtgtgcg atacatttg tttggttttt 60

agagacacca cgactttact caataatatt aatgccaccc accaccaagc gcaaatttt 120

gatgcgattt attctaaaac tttgaaggc gggttgcacc ccttagtgaa aaagcattta 180

cacccttatt tcatacacgca aaacatcaaa gacatgggga ttacaaccaa tctcatcagt 240

gaggttctta agttttatta cgctttaaaa taccatgcga agtttatgag ctgggggag 300

cttgggtgct atgcgagcca ttattcatttgg tggaaaaat gcatagaact caatgaagcg 360

atctgtattt tagaagacga tataacctta aaaggaggatt ttAAAGAGGG attggatttt 420

ttagaaaaac acatccaaga gttaggctat gttcgcttga tgcatattt atatgacccc 480

aatgttaaaa gtgagccatt gaaccataaa aaccacgaga tacaagagcg tgtggggatc 540

attaaagctt atagtcatgg ggtggggacg caaggctatg tgatcacgccc caagattgcc 600

aaagtttta aaaaacacag ccgaaaatgg gttgttcctg tggatacgat aatggacgct 660

acttttatcc atggcgtgaa aaatctggtg ttacaacctt ttgtgatcgc tcatgtatgag 720

cagatctcta cgatagcacg aaaagaagaa ccttatagcc ctAAAATCGC cttaatgaga 780

gaactccatt ttaaatatTTT gaaatattgg cagTTTgta 819

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

cctatgagct ctTTTtatcat ttct

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

agcggatcct aaaaagtctt agt

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

ggtaaagctt atgcagcctc tggttccgt

30

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

aaacggatcc ttggctctgc attagatct

29

「配列表フリーテキスト」

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/54, C12N9/10, C12P19/18, C12N1/21, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/54, C12N9/10, C12P19/18, C12N1/21, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 2-27987, A (Gakkou Houjin Keiou Gijuku), 30 January, 1990 (30. 01. 90), Full text (Family: none)	1-3 5, 7-8, 10-12
Y	Elizabeth, E.B. et al., "Expression of deletion constructs of bovine beta-1,4-galactosyltransferase in <i>Escherichia coli</i> : importance of Cys134 for its activity" Protein Eng. (1993) Vol. 6, No. 7 p.779-785	5, 7-8, 10-12
A	Jean-F.T. et al., "The complete genome sequence of the gastric pathogen <i>Helicobacter pylori</i> " Nature (1997) Vol. 388 p.539-547	1-12
A	Nora, W.C.C. et al., "The biosynthesis of Lewis X in <i>Helicobacter pylori</i> " Glycobiology (1995) Vol. 5, No. 7 p.683-688	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
6 April, 1999 (06. 04. 99)Date of mailing of the international search report
20 April, 1999 (20. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/00321

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/54, C12N 9/10, C12P 19/18, C12N 1/21, C12Q 1/6
8

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/54, C12N 9/10, C12P 19/18, C12N 1/21, C12Q 1/6
8

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 2-27987, A (学校法人慶應義塾) 30.1月.1990 (30.01.90) 全文 (ファミリーなし)	1-3 5, 7-8, 10-12
Y	Elizabeth, E. B. et al "Expression of deletion constructs of bovine beta-1, 4-galactosyltransferase in <i>Escherichia coli</i> : importance of Cys134 for its activity" Protein Eng. (1993) 第6巻 第7号 p. 779-785	5, 7-8, 10-12
A	Jean-F. T. et al. "The complete genome sequence of the gastric pathogen <i>Helicobacter pylori</i> " Nature (1997) 第388巻 p. 539-547	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 04. 99

国際調査報告の発送日

20.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

引地 進



4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 6281

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nora, W.C.C. et al. "The biosynthesis of Lewis X in <i>Helicobacter pylori</i> " Glycobiology (1995) 第5巻 第7号 p.683-688	1-12